

517,702

Rec'd PCT 13 DEC 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003)

PCT

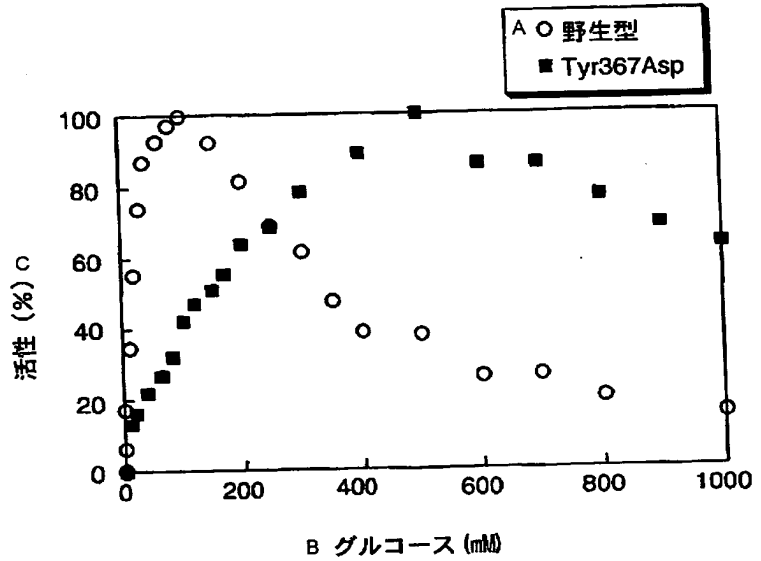
(10) 国際公開番号
WO 03/106668 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/04, 15/53, 15/63, 1/21, C12Q 1/32, 1/54 // (C12N 9/04, C12R 1:19)
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 早出 広司 (SODE,Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南 1-13-16 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07542
- (74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA,Reiko et al.); 〒100-6036 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル 3 6 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 13 日 (13.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-172955 2002 年 6 月 13 日 (13.06.2002) JP
特願2003-71744 2003 年 3 月 17 日 (17.03.2003) JP

[続葉有]

(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素



A...WILD-TYPE
B...GLUCOSE (mM)
C...ACTIVITY (%)

(57) Abstract: A glucose dehydrogenase using pyrroloquinoline quinone as a coenzyme, wherein the amino acid residues corresponding to the 349th to 377th residues of water-soluble PQQGDH derived from *Acinetobacter calcoaceticus* are replaced by other amino acid residues and whose inhibition constant (K_{si}) is 200 mM or higher. The thus altered water-soluble PQQGDH is useful in the measuring of glucose in the presence of high-concentration glucose because of low level of substrate inhibition by glucose.

(57) 要約: ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 349 番目から 377 番目の

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/106668 A1



- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ阻害定数 (K_{si}) が 200mM 以上であるグルコース脱水素酵素が提供される。本発明の改変型水溶性 PQQGDH は、グルコースによる基質阻害が小さいため、高濃度のグルコースの存在下におけるグルコースの測定に有用である。

明細書

グルコース脱水素酵素

技術分野

- 5 本発明はピロロキノリンキノン（PQQ）を補酵素とするグルコース脱水素酵素（GDH）の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素に関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

10 背景技術

- 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素（G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。最近、新たな酵素としてピロ
- 15 ロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQGDH）の応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、
- 20 アッセイ分野への応用が期待されている。

- PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々
- 25 のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは *Acinetobacter calcoaceticus* のいくつかの株においてその存在が確認されており（*Biosci. Biotech. Biochem.*（1995），59（8），1548-1555）、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている（*Mol. Gen. Genet.*

- (1989), 217:430-436)。A. calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのサブユニット2つからなるホモダイマーを形成する水溶性酵素であり、活性を示すためにPQQとCa²⁺を必要とし、2200U/mg～7400U/mgという高い酵素活性を示す。等電点5が、PQQと結合していないアが酵素で約9.2、ホロ酵素で約10.2である塩基性蛋白質であることなどが知られている(K. Matsushita, et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1548-1555)。また、水溶性PQQGDHのX線構造解析の結果が発表されており(A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Bio., 289, 319-333、A. Oubrie, et al. (1999) The EMBO Journal, 18(19), 5187-5194およびA. Oubrie, et al. (1999), PNAS 96(21), 11787-11791)、水溶性PQQGDHの立体構造やPQQおよびCa²⁺の推定存在位置などが明らかにされている。
- 15 野生型水溶性PQQGDHでは、グルコース濃度が100mM以上のとき基質阻害による活性の低下が顕著に見られる。このため、高濃度の基質の存在下では、定量的な基質濃度の測定を行うことが困難である。現在のところ、この基質阻害のメカニズムは明らかにされていない。
- したがって、本発明は、基質阻害による酵素活性の低下が少ない改変型水溶性
- 20 PQQGDHを提供することを目的とする。

発明の開示

- 本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良して高濃度のグルコースの存在下においてもグルコースの定量を可能とする改変型PQQGDHを開発すべく鋭意
- 25 研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースによる基質阻害の少ない酵素を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの349

番目から 377 番目の残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ阻害定数 (K_{si}) が 200 mM 以上であるグルコース脱水素酵素を提供する。

- 5 本明細書において用いる場合、阻害定数 (K_{si}) とは、観察される最大酵素活性の二分の一の活性を与える基質濃度のうち、高濃度側の基質濃度を意味する。阻害定数とは、酵素活性において基質阻害が観察されるときにおいて、次式で定義される酵素固有の定数を意味する：

$$v = V_{max} / [1 + (K_m / S) + (S / K'_{si})]$$

- 10 [ただし、 v は反応速度、 V_{max} は最大反応速度、 K_m はミハエリス・メンテン定数、 S は基質濃度、 K'_{si} は阻害定数の理論値を表す]。 K'_{si} が大きいほど、基質阻害が見られる基質濃度が大きくなり、基質阻害が緩和される。夾雑物を含む系で K'_{si} を正確に測定することは困難であるため、本明細書においては、実測可能な値として上述した K_{si} を用いる。

- 15 特定の理論に拘束されるものではないが、A. Oubrie らが明らかにした PQQGDH の立体構造に基づくトポロジーの予測にしたがえば、349 番目から 377 番目のアミノ酸の領域は 4D5A ループを形成する領域に該当するため、この領域が基質であるグルコースとの相互作用に関与していると考えられる。

- 20 本明細書においてアミノ酸残基または領域に関して用いる場合、「相当する」との用語は、構造上類似するが同一ではない 2 以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の機能を有することを表す。例えば、Acinetobacter calcoaceticus 以外の生物に由来する水溶性 PQQGDH において、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性 PQQGDH の 349 番目から 377 番目の残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考
- 25 えられる場合、該領域は「Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性 PQQGDH の 349 番目から 377 番目の残基の領域に相当する」と言われる。さらに、該領域の第 17 番目のアミノ酸残基は「Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性 PQQGDH の 365 番目の残基に相当する」と言われる。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを 1 として番号付けする。

好ましくは、本発明のグルコース脱水素酵素は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、365 番目のメチオニン、366 番目のトレオニン、367 番目のチロシン、368 番目のイソロイシン、369 番目のシステインおよび 374 番目のアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする。

より好ましくは、本発明のグルコース脱水素酵素は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、Met365Trp、Met365Phe、Thr366Asn、Thr366Ile、Thr366Asp、Thr366Lys、Tyr367Asp、Ile368Asn、Cys369Arg および Ala374Pro からなる群より選択される変異を有する。

また別の態様においては、本発明の改変型 PQQGDH は、上述の置換に加えて、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で、特に好ましくはグルタミン酸残基で置換されている。167 番目のアスパラギン酸残基が PQQGDH による基質の認識および結合に関与することは、特開 2001-346587 に記載されている。しかし、一般的には、4D5A ループに存在するアミノ酸残基と、これらとは異なるドメインに存在するアミノ酸残基とに同時に変異を導入することにより、基質の選択性や酵素活性がどのように変化するかについては、全く予測することができない。したがって、本発明において、これらの変異を同時に導入することによりグルコースの選択性の向上と高い酵素活性の両方が得られたことは、驚くべき発見であった。

また別の観点においては、本発明は、

Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

(式中、Xaa は Met または Trp である)；

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

(式中、Xaa は Asp、Lys、Ile または Asn である)；

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp；

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro；

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr；および

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

からなる群より選択される配列を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグ

ルコース脱水素酵素を提供する。

本発明はまた、上述のPQQGDHをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、および本発明のPQQGDHの製造方法、ならびに本発明のPQQGDHを含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

本発明のPQQGDHの酵素蛋白質はグルコースによる基質阻害が小さいため、高濃度のグルコースの存在下におけるグルコースの測定に有用である。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、本発明において用いたプラスミドpGB2の構造を示す。
図2は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。
図3は、本発明の改変型酵素Tyr367AspのSVプロットを示す。
図4は、本発明の改変型酵素Cys369ArgのSVプロットを示す。

15

発明の詳細な説明

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

- 20 本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版,
25 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白

質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

- 本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。
- 5 さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus 由来の水溶性PQQGDHの349番目から377番目の領域に相当する領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のア
- 10 ミノ酸残基で置換することにより、基質阻害の減少した改変型PQQGDHを得ることができる。これらの改変型PQQGDHも本発明の範囲内である。

- 上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に
- 20 放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。

- 次に、得られた水溶性画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製する。精製は、蛋白質のクロマトグラフィー精製についての当該技術分野において
- 25 一般に知られる教科書の記載にしたがって行うことができる。蛋白質の精製に用いることができる種々の陽イオン交換クロマトグラフィー用カラムが当該技術分野において知られており、これらのいずれを用いてもよい。例えば、CM-5PW、CM-Toyopearl 650M、SP-5PW（以上、東ソー株式会社）、S-セファロース、Mono-S、S-Resource（以上ファルマシ

ア社)を用いることができる。カラムを適当なバッファーで平衡化し、試料をカラムに負荷し、未吸着成分を洗い流す。バッファーとしては、例えばリン酸バッファー、MOPSバッファー等を用いることができる。

次に、塩濃度のより高いバッファーを用いて、カラムに吸着された成分を溶出する。塩濃度は、塩濃度の異なる複数のバッファーを用いて、段階的に、直線勾配により、またはこれらの組み合わせにより変化させることができる。試料の溶出は吸光度測定などによりモニターし、適当な量ずつ分取する。各画分について酵素活性を測定して、所望の画分を回収することにより、本発明の改変型酵素を精製標品として得ることができる。

10 さらに、陽イオンクロマトグラフィーの前または後に、必要に応じて、濾過、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の、蛋白質の精製に関して当該技術分野において知られる他の手法による精製を行ってもよい。

酵素活性の測定方法

15 本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PM
20 S (フェナジンメトサルフェート) -DCIP (2, 6-ジクロロフェノールイ
ンドフェノール)、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることがで
きる。

基質阻害の評価方法

本発明のPQQGDHの基質阻害の程度は、阻害定数(K_{si})を用いて評価
することができる。 K_{si} は、種々の濃度のグルコースを基質として用いて、上
25 述のように酵素活性を測定したとき、観察される最大酵素活性の二分の一の活性
を与える基質濃度のうち、高濃度側の基質濃度として表される。

基質特異性の評価方法

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオ
キシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコー

ス、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

グルコースアッセイキット

- 5 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならび
- 10 に使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

- 15 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセン
- 20 あるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化することが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQ
- 25 GDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドの遊離官能基をブロックする。

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメ

トサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2003-71744ならびに2002-172955号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

15 実施例1

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。常法に従って部位特異的変異法により、天然のPQQGDHをコードする塩基配列をそれぞれ目的とする変異を有するPQQGDHをコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を以下に示す。2カ所の変異を有する変異体を作成するためには、2種類のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを同時に用いて上記と同様に変異を導入した。

- Met365Trp 3'-GT TGA ACA CCT CTC CCA TGG ATG TAA AC-5'
- Met365Phe 3'-GT TGA ACA CCT CTC CCT TGG ATG TAA AC-5'
- Thr366Asn 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TTG ATG TAA ACG AC-5'
- Thr366Ile 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TAG ATG TAA ACG AC-5'
- 5 Thr366Asp 3'-GA ACA CCT CTC TAC CTG ATG TAA ACG ACC G-5'
- Thr366Lys 3'-GA ACA CCT CTC TAC TTT ATG TAA ACG ACC G-5'
- Tyr367Asp 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TGG CTG TAA ACG ACC-5'
- Ile368Asn 3'-AC TGG ATG TTA ACG ACC GG-5'
- Cys369Arg 3'-GG ATG TAA ACG ACC GGT TGT C-5'
- 10 Ala374Pro 3'-C GGT TGT CAA GGT GGC AGT AGA CG-5'
- Asp167Glu 3'-GGA AGT AGT TTT CTT GTA GTC AGT CC-5'

- ベクタープラスミド p K F 1 8 k (宝酒造 (株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 P Q Q G D H をコードする遺伝子の一部を含む Kpn I-Hind
- 15 III 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造 (株) 製 M u t a n (登録商標) - E x p r e s s K m キットに付属のセレクトンプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20 μ l) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100°C、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本鎖にした。セ
- 20 レクシンプライマーは p K F 1 8 k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3 μ l の同キットエクステンションバッファー、1 μ l の T4 DNA リガーゼ、1 μ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5 μ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これを DNA のミスマッチ修復能欠
- 25 損株である *E. coli* BMH 71-18 mutS に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、菌体から抽出したプラスミドを *E. coli* MV 1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド

pGB2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片と入れ替え、各変異を有する改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

実施例2

5 改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地（アンピシリン50 μ g/ml含有）で坂口フラスコを用いて37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、500 μ M PQQを含む7LのL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。菌体を遠心分離（5,000 \times g, 10min, 4 $^{\circ}$ C）で集菌した後、0.85% NaCl溶液で2回洗浄した。この菌体を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で懸濁し、フレンチ・プレスで破碎（110MPa）した後、遠心分離（15,000 \times g, 15min, 4 $^{\circ}$ C）を2回行い、未破碎菌体を沈殿として除去した。この上清を超遠心分離（40,000r.p.m., 90min, 4 $^{\circ}$ C）し、その上清を水溶液画分として得た。これをAバッファー（10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0））で4 $^{\circ}$ Cにて一晩透析し、粗精製画分を得た。

20

実施例3

酵素活性の測定

酵素活性の測定は、室温で10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM⁻¹とした。

実施例 4

基質阻害の評価

- 実施例 3 で得られた野生型 PQQGDH および各改変型 PQQGDH の粗精製酵素標品を用いて、実施例 5 と同様にそれぞれ $1 \mu\text{M}$ PQQ、 1mM CaCl_2 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを $187 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $3 \mu\text{l}$ の活性試薬 (6mM DCIP $48 \mu\text{l}$, 600mM MPMS $8 \mu\text{l}$, 10mM リン酸緩衝液 pH 7.0 $16 \mu\text{l}$) および各濃度の D-グルコース溶液 $10 \mu\text{l}$ を加え、実施例 4 に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性の
- 10 プロットから、 K_m 、 V_{max} および K_{si} を求めた。結果を表 1 に示す。また、Tyr 367 Asp の SV プロットおよび Cys 369 Arg の SV プロットをそれぞれ図 3 および図 4 に示す。これらの結果から明らかなように、本発明の改変型 PQQGDH は野生型 PQQGDH と比較して高い K_{si} 値を示し、基質阻害が有意に低下していた。

15

表 1

	K_m (mM)	V_{max} (U/mg 蛋白質)	K_{si} (mM)	K_{si}/K_m
野生型	23	154	196	8
Met365Phe	36	619	394	10
Met365Trp	38	89	458	12
Thr366Asn	32	300	500	15
Thr366Ile	39	87	228	6
Thr366Asp	35	196	556	16
Thr366Lys	23	300	202	9
Tyr367Asp	280	11	830	3
Ile368Asn	61	60	535	9
Cys369Arg	65	6	1402	22
Ala374Pro	n.d.	2	250	n.d.

実施例 5

酵素の精製

実施例 2 で得られた粗精製酵素を 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSK gel CM-TOYO PEARL 650M (東ソー株式会社) に吸着させた。このカラムを 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0、750 ml で洗浄した後、0.2 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 を用い、酵素を溶出させた。流速は 5 ml/min で行った。GDH 活性を有する画分を回収し、10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で一晚透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型 PQQGDH 蛋白質を得た。得られた精製酵素標品について、0.6 mM の PMS 存在下で、酵素活性および基質の阻害を測定した。結果を表 2 に示す。本発明の改変型酵素 Thr366Asn および Thr366Asp は、高い K_{si} 値を有するのみならず、野生型と匹敵するかまたはそれより高い酵素活性を示した。

表 2

	K_m (mM)	V_{max} (U/mg 蛋白質)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	K_{si} (mM)	K_{si}/K_m
野生型	27	8899	7451	276	250	9
Thr366Asn	14	10158	8505	608	522	37
Thr366Asp	28	5166	4283	153	332	12

実施例 6

二重変異酵素の作製

二重変異酵素 Asp167Glu/Thr366Asn を製造し、その性質を調べた。Asp167Glu 変異を有する改変型酵素は、グルコースに対する基質特異性が高いことが知られている。実施例 5 と同様にして基質阻害を調べたところ、 $K_{si} = 600 \text{ mM}$ 、 $K_m = 26 \text{ mM}$ であり、したがって $K_{si}/K_m = 23$ であった。この値は実施例 5 で測定した本発明の各改変型酵素と同等であり、野生型酵素より大きい。

次に、この二重変異酵素の基質特異性を調べた。実施例 2 で得られた野生型お

- よび各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1 μ M PQQ、1 mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μ lずつ分注し、3 μ lの電子受容体を含む活性試薬（6 mM・DCIP、600 mM PMS、10 mMリン酸緩衝液pH 7.0を含む）および基質を加えた（終濃度0.06 mM DCIP、0.6 mM PMS）。基質として、それぞれ終濃度100 mMとなるように400 mMのグルコース、ラクトースおよびマルトースを10 μ l加え、室温で30分間インキュベートして、実施例3と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100とし、これに対する相対活性で表した。結果を表3に示す。Thr366AsnとAsp167Gluとの二重変異を有する改変型酵素は、野生型およびAsp167Glu単独の変異を有する改変型酵素と比較してグルコースに対する高い基質特異性を示した。なお、Thr366Asn単独の変異を有する改変型酵素は野生型と同等の基質特異性を有する（データ示さず）。

表3

	グルコース	ラクトース	マルトース
野生型	100%	54%	58%
Asp167Glu	100%	32%	10%
Asp167Glu/Thr366Asn	100%	20%	

15

- さらに、この二重変異酵素について、電子受容体として終濃度0.06 mMのDCIPの存在下で、基質濃度10 mMのグルコースを用いて、実施例3と同様にして酵素活性を測定した。値は野生型の活性を100とし、これに対する相対活性で表した。結果を表4に示す。Thr366AsnとAsp167Gluとの二重変異を有する改変型酵素は、野生型酵素と比較して高い酵素活性を有していた。

20

表4

野生型	100%
Thr366Asn	126%
Asp167Glu	54%
Asp167Glu/Thr366Asn	291%

実施例 7

酵素センサーの作製および評価

- 5 Uの改変型酵素にカーボンペースト 20 mg を加えて凍結乾燥させた。これ
- 5 をよく混合した後、既にカーボンペーストが約 40 mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1 %のグルタルアルデヒドを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 30 分間処理した後、20 mM リジンを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で
- 10 室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4°C で保存した。

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型 PQQGDH を固定化した酵素センサーを用いて、5 mM - 50 mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

15

産業上の利用性

本発明の改変型水溶性 PQQGDH は、グルコースによる基質阻害が小さいため、高濃度のグルコースの存在下におけるグルコースの測定に有用である。

20

請求の範囲

1. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、
Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの349番目から377
5 番目の残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ
阻害定数 (K_{si}) が200mM以上であるグルコース脱水素酵素。
2. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の365番目のメチオニンが他のアミ
ノ酸残基で置換されており、かつ K_{si} が200mM以上である、ピロロキノリ
ンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。
- 10 3. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の365番目のメチオニンがトリプト
ファンまたはフェニルアラニンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵
素とするグルコース脱水素酵素。
4. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の366番目のトレオニンが他のアミ
ノ酸残基で置換されており、かつ K_{si} が200mM以上である、ピロロキノリ
15 ンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。
5. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の366番目のトレオニンがアスパラ
ギン酸、リジン、イソロイシンまたはアスパラギンで置換されている、ピロロキ
ノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。
6. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の367番目のチロシンが他のアミノ
20 酸残基で置換されており、かつ K_{si} が200mM以上である、ピロロキノリン
キノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。
7. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の367番目のチロシンがアスパラギ
ン酸で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素
酵素。
- 25 8. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の368番目のイソロイシンが他のア
ミノ酸残基で置換されており、かつ K_{si} が200mM以上である、ピロロキノ
リンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。
9. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の368番目のイソロイシンがアスパ
ラギンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水

素酵素。

10. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の369番目のシステインが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK s iが200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

5 11. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の369番目のシステインがアルギニンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

12. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の374番目のアラニンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK s iが200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

10 13. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の374番目のアラニンがプロリンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

14. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の349番目から377番目のいずれかのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ167番目のア

15 スパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

15. 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、365番目のメチオニン、366番目のトレオニン、367番目のチロシン、368番目のイソロイシン、369番目のシステインおよび374番目のアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ167番目のアスパ

20 ラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

16. 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、365番目のメチオニン、366番目のトレオニン、367番目のチロシン、368番目のイソロイシン、369番目のシステインおよび374番目のアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ167番目のアスパ

25 ラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

17. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の366番目のトレオニンがアスパ

ラギン酸、リジン、イソロイシンまたはアスパラギンで置換されており、かつ167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

18. 配列:

5 Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

(式中、Xaa は Met または Trp である)を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

19. 配列:

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

10 (式中、Xaa は Asp、Lys、Ile または Asn である)を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

20. 配列:

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

15 21. 配列:

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

22. 配列:

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr

20 を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

23. 配列:

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

24. 請求項1-23のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素をコードする

25 遺伝子。

25. 請求項24に記載の遺伝子を含むベクター。

26. 請求項24に記載の遺伝子を含む形質転換体。

27. 請求項24に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項22記載の形質転換体。

28. 請求項27に記載の形質転換体を培養し、菌体から水溶性画分を調製することを含む、水溶性PQQGDHの製造方法。

29. 請求項1-23のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

5 30. 請求項1-23のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

1/4

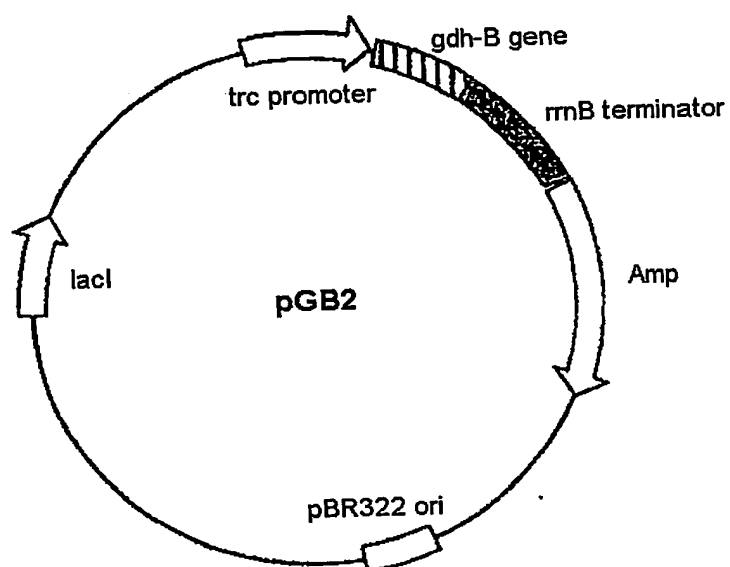


図 1

2/4

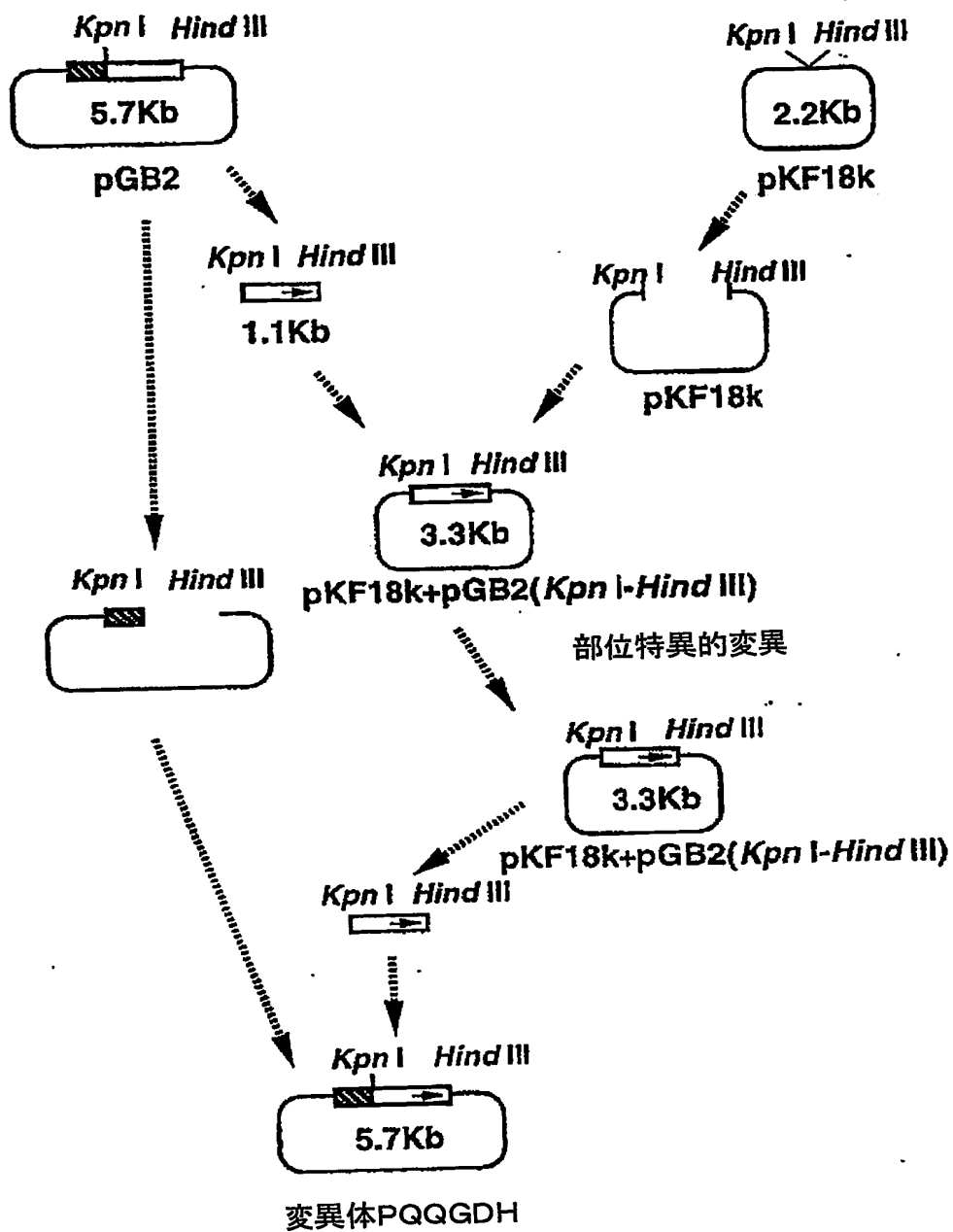


図 2

3/4

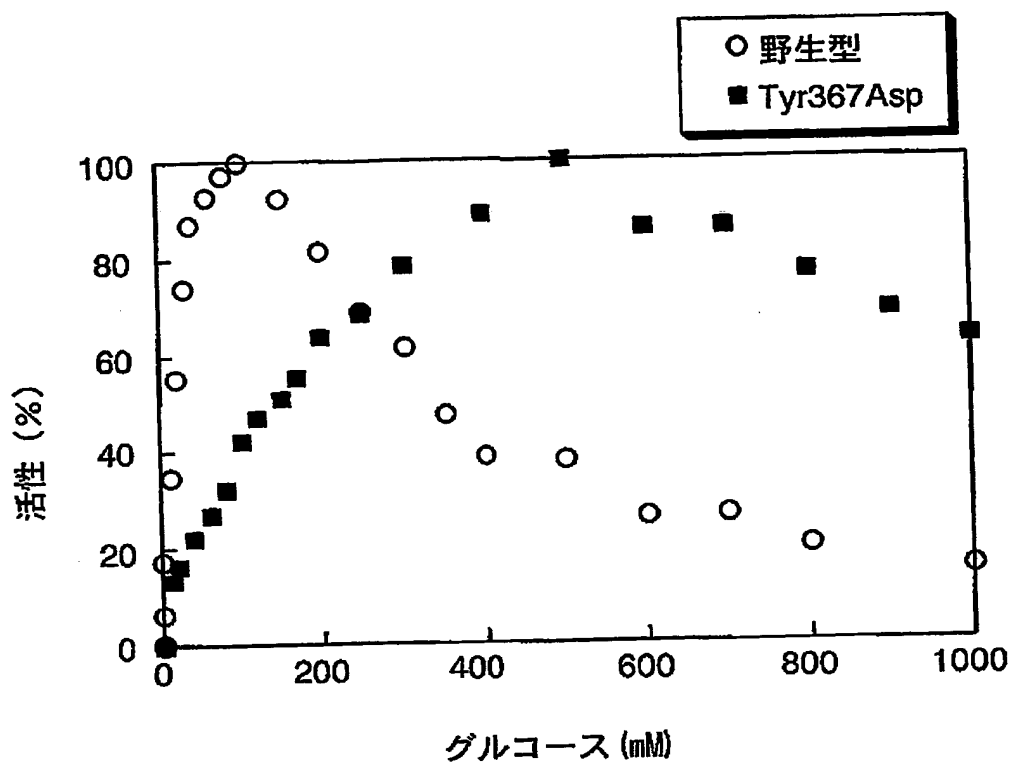


図 3

4/4

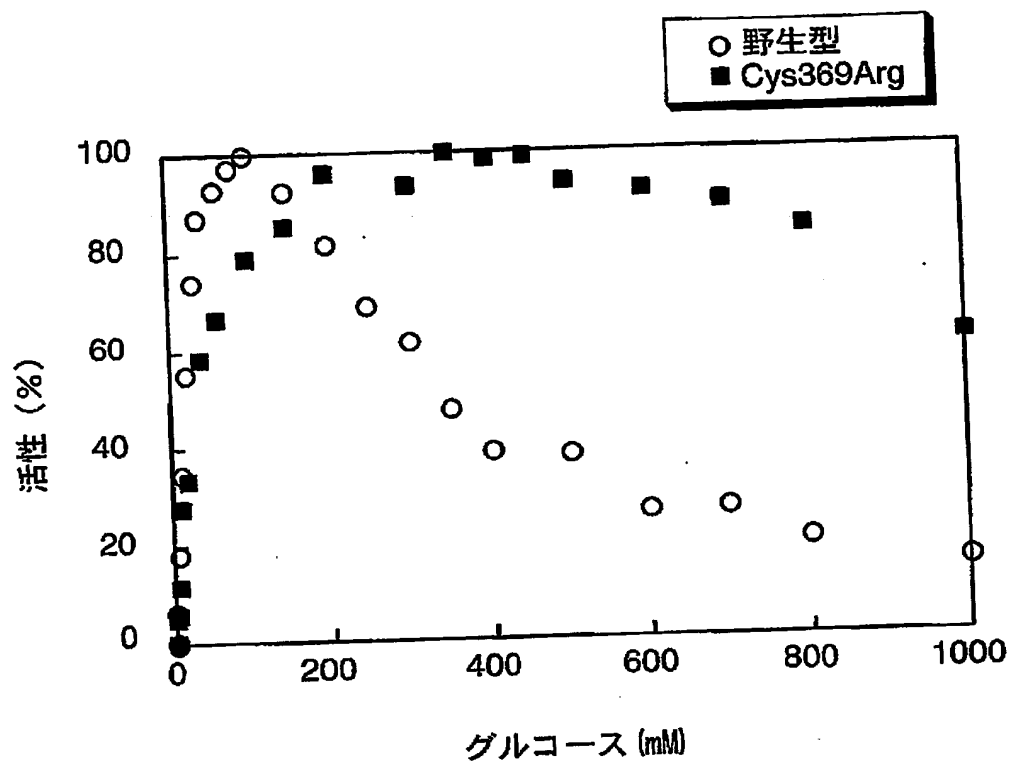


図 4

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> psd9009W0

<150> JP 2003-71744

<151> 2003-03-17

<150> JP 2002-172955

<151> 2002-06-13

<160> 19

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
1 5 10 15
Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
20 25 30
Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
35 40 45
Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
50 55 60
Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
65 70 75 80
Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
85 90 95
Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
100 105 110
Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115 120 125
Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
130 135 140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
145 150 155 160
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
165 170 175
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
180 185 190
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
195 200 205
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
210 215 220
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
225 230 235 240
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
245 250 255
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
260 265 270
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
275 280 285
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
290 295 300
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
305 310 315 320
Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
325 330 335
Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
340 345 350
Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu

355 360 365
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatacaa atcatataga gaactcgtag aaacccttta ttagagggtt aaaaattctc 120
 ggaaaatttt gacaatttat aagggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180
 tttattaagc gctgttcagc tagttacact ctgagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagttattc tatctaattc 300
 aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360
 aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420
 accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg cttccatcc 480
 tgattttaaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600
 tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaaag accatcagtc 660
 aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattggtg accaagggcg 720

taaccagctt gcttatttgt tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780
actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840
aagtattcca aaggataatc caagttttta cgggggtggt agccatattt atacacttgg 900
acatcgtaat ccgcagggct tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
gaatgtagca gggtataaag atgatagtgg ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080
caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtagccgcag ggtccctgt 1140
gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320
ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380
agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500
cggaaatgtc caaaaagatg atggctcagt acaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560
cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 4

<223> Xaa is Met or Trp

<400> 3

Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 4

<223> Xaa is Asp, Lys, Ile or Asn

<400> 4

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 5

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 6

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 7

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 8

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

caaatgtagg taccctctcc acaagttg 28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

caaatgtagg ttccctctcc acaagttg 28

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

cagcaaagt agttcatctc tccacaagtt gg 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 12

cagcaaagt agatcatctc tccacaagtt gg 32

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 13

gccagcaaatt gtagtccatc tctccacaag 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 14

gccagcaaatt gtatttcatc tctccacaag 30

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 15

ccagcaaattg tcggtcatct ctccacaagt tgg 33

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 16

ggccagcaat ttaggtca 19

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 17

ctgttggcca gcaaatgtag g 21

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 18

gcagatgacg gtggaactgt tggc 24

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 19

cctgactgat gttcttttga tgaagg 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/04, 15/53, 15/63, 1/21, C12Q1/32, 1/54 // (C12N9/04, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/04, 15/53, 15/63-869, 1/14-21, 5/10-28, C12Q1/32, 1/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)
WPIDS (STN), BIOSIS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroshi HAYADE et al., "CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 79 Shunki Nenkaï - Koen Yokoshu II", CSJ: The Chemical Society of Japan, 15 March, 2001 (15.03.01), page 897, upper right column	1-30
Y	A. OUBRIE et al., "Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase", EMBO J., 1999, Vol.18, No.19, p.5187-94	1-30
Y	A. OUBRIE et al., "The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus reveals a novel internal conserved sequence repeat", J.Mol.Biol., 1999, Vol.289, No.2, p.319-33	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2003 (21.08.03)

Date of mailing of the international search report
02 September, 2003 (02.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07542

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-346587 A (Hiroshi HAYADE), 18 December, 2001 (18.12.01), Claims; Par. Nos. [0004], [0006], [0015] (Family: none)	14-17, 24-30
A	EP 1167519 A1 (Hiroshi HAYADE), 02 January, 2002 (02.01.02), & WO 00/61730 A1	1-30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/04, 15/53, 15/63, 1/21, C12Q1/32, 1/54// (C12N9/04, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/04, 15/53, 15/63-869, 1/14-21, 5/10-28, C12Q1/32, 1/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq MEDLINE (STN) WPIDS (STN) BIOSIS (STN) JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	早出広司他, 日本化学会第79春季年会—講演予稿集 I I, 社団法人日本化学会, 2001. 03. 15, 第897頁, 右上欄	1-30
Y	A. OUBRIE et al., "Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase", EMBO J., 1999, Vol. 18, No. 19, p. 518 7-94	1-30
Y	A. OUBRIE et al., "The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus reveals a novel internal conserved s	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 08. 03

国際調査報告の発送日

02.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

印

4 N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	sequence repeat" J. Mol. Biol., 1999, Vol. 289, No. 2, p. 319-33 JP 2001-346587 A (早出広司) 2001. 12. 18, 特許請求の範囲, 【0004】, 【0006】, 【0015】 (ファミリーなし)	14-17, 24-30
A	EP 1167519 A1 (早出広司) 2002. 01. 02, &WO 00/61730 A1	1-30

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.